

選択的スプライシングの巧妙さとその破綻

神経難病発症に関連する異常スプライシング

今泉和則

ひとつの遺伝子から多種類の蛋白質を生じることにより、ヒトではすべての遺伝子の数よりもはるかに多い20万種類以上の蛋白質が作り出されている。この多様性を生み出す駆動力は、mRNAの選択的スプライシングである。ところが、本来は精密であるべき選択的スプライシングに異常が生じた場合、機能を欠いた蛋白質あるいは細胞傷害性の異常蛋白質が産生され、ときとして疾患発症に結びつく。本稿では、巧妙に制御されたスプライシングの分子機構と、それが破綻したときに生じる神経疾患の発症機序について紹介する。

Key words スプライシング SR蛋白質 神経疾患 RNA

はじめに

詳細なゲノム解析により、ヒト遺伝子の総数は約22,000個であることが判明した。これは当初の予想よりもかなり少なく、ショウジョウバエと同じぐらいの遺伝子数にとどまる。ここから翻訳により作り出される蛋白質は20万種あまりと考えられ、ひとつの遺伝子から多種類の蛋白質を生じることによって、全遺伝子数よりもはるかに多い、多種多様の蛋白質が作り出されている。この多様性を生み出す駆動力が、mRNAの選択的スプライシングにあることはいうまでもない。正しい蛋白質発現のための成熟mRNAの合成には、遺伝子に散在するエキソンが正確に選択され、それを分断する、はるかに長いイントロンを取り除くスプライシング機構が精密に稼働しなければならない。また、スプライシングに加えて、mRNAの安定化、細胞内輸送、さらには蛋白質への翻訳過程が連動し、それぞれのステップが相互にネットワークを形成して機能的RNAおよび蛋白質合成が行なわれていることも最近ではわかってきている。

これらRNA自身、あるいはRNA情報発現系の時間的・空間的なネットワークの解析は、ポストゲノム時代の研究として脚光を浴び、現在、爆発的に拡大してきている。RNAワールドの新しい展開は分子・細胞レベルにとどまらず、高次生命現象にも拡大している。スプラ

イシングを含めた転写後調節に破綻が生じた場合、機能を欠いた蛋白質や細胞傷害をもたらす蛋白質が産生され、種々の疾患発症に結びつくことがあることも、遺伝学の発展が後押しとなって徐々に理解されるようになってきた。RNA情報発現系の異常に伴う疾患の分子機構が解明できれば、さまざまな難病の治療法開発につながるるとともに、RNA機能が高次生命現象に果たす役割の解明も可能になる。

本稿では、転写後調節のうち、成熟mRNA発現の多様性を決定するスプライシングをクローズアップし、その制御機構の詳細と、それが破綻したときに生じる神経難病の発症機構について紹介する。

I. スプライシング制御の巧妙さ

遺伝子から前駆体mRNAが転写されたのち、イントロンを取り除き、前後のエキソンどうしを結合する反応をmRNAスプライシングという。1種類の遺伝子から一定のスプライシングにより1種類のmRNAが産生される場合を恒常的スプライシング、エキソンが選択されて複数のタイプのmRNAが産生される場合を選択的スプライシングとよんでいる。イントロンの平均鎖長が3,365塩基であるのに対し、エキソンは平均145塩基と

Kazunori Imaizumi, 宮崎大学医学部 解剖学講座分子細胞生物学分野 E-mail: imaizumi@med.miyazaki-u.ac.jp
Molecular mechanisms of aberrant splicing in neurological disorders

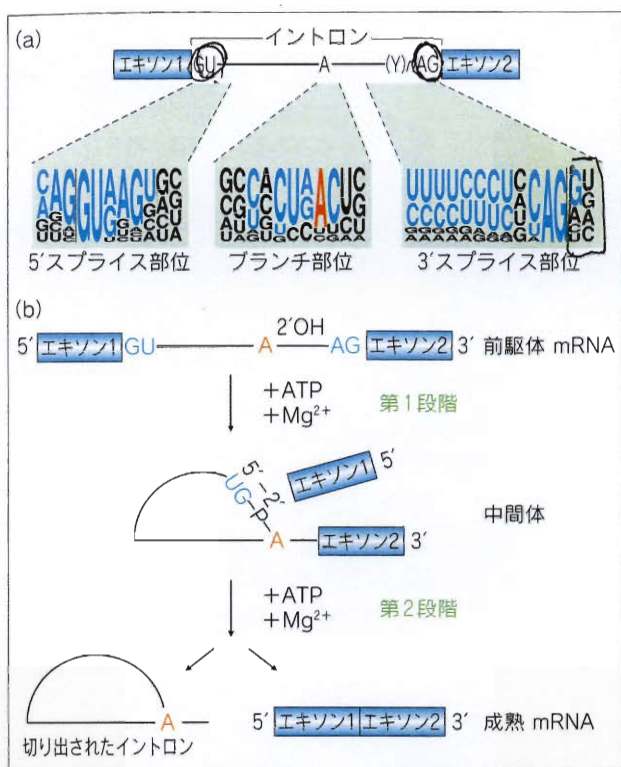


図 1 スプライシング信号配列の保存性と mRNA スプライシング反応

(a) エキソン-イントロン結合部とブランチ部位における塩基配列の保存性を示す。青：保存性の高い配列，オレンジ：ブランチ部位。Yはポリピリミジントラクト(CあるいはUのくり返し配列)。1,683種のヒトゲノムイントロン配列の調査から，それぞれの部位での出現頻度を文字の大きさに対応させて描いてある。縦線はエキソン-イントロンの境界部を示す。

[文献 2 より改変，許可を得て転載]

(b) mRNA スプライシング反応は ATP と Mg²⁺ を必要とする。第 1 段階でイントロンの投げ縄構造が形成されたのち，第 2 段階でイントロンが切り出される。

きわめて短い。細胞は，この長いイントロン領域をいかに認識し，エキソンだけを結びつけているのだろうか？

1. 恒常的スプライシング

遺伝子配列におけるスプライシングの規則性として，イントロンとエキソンの境目(スプライス部位)の配列は，5'側は必ず GT で始まり，3'側は AG で終わることがわかっている¹⁾。この GT-AG 則は，酵母や植物から脊椎動物にいたるまで，真核生物の細胞種をこえて保存されており，スプライシングが普遍的なメカニズムで制御されていることがわかる。これに加えて，イントロンの両端付近とイントロン内部の 3' スプライス部位近傍に存在するブランチ部位周辺は比較的保存性の高い領域

であり，それらがスプライス部位認識シグナルとして機能していることもわかっている。データベースを用いた統計学的解析により明らかとなった，ヒト遺伝子のスプライス部位およびブランチ部位周辺における塩基配列の保存性を，図 1a に示した²⁾。出芽酵母では，スプライス部位およびブランチ部位の共通配列が厳密に保存されているが，脊椎動物の場合，GT-AG 則以外の保存性は比較的低く，とくにブランチ部位の保存性は低くなっている。

スプライシング反応は，図 1b に示すように，ATP と Mg²⁺ を必要とする 2 段階の反応によって行なわれる³⁾。反応の第 1 段階では，5' スプライス部位での切断が起こると同時に，切断されたイントロンの 5' 末端のグアノシン残基(G)が，ブランチ部位のアデノシン残基(A)の 2'OH とのあいだで 2'-5'リン酸ジエステル結合を形成する。このとき，切り出された 5' 側エキソン，および，イントロンと 3' 側エキソンからなる投げ縄構造をもった反応中間体が形成される。第 2 段階では，投げ縄構造をとっているイントロンが切り出され，それと同時に，前後のエキソンの再結合反応が行なわれる。

スプライシングは，細胞核内においてスプライソソームとよばれる複合体の中で進行する⁴⁻⁶⁾。スプライソソームを構成するのは，核内低分子 RNA (small nuclear RNA ; snRNA) を含む蛋白質-RNA 複合体 snRNP (small nuclear ribonucleoprotein particle, U1, U2, U5, U4/U6-snRNP などがある) と，RNA 成分を含まない 50 種類以上の蛋白質因子群である。snRNA のうち，U4-snRNA と U6-snRNA は塩基対合を形成し単一の snRNP に含まれる。snRNP と蛋白質因子は，snRNP どうしや前駆体 mRNA との RNA-RNA 結合 (snRNA と前駆体 mRNA のスプライス部位あるいはブランチ部位における結合)，RNA-蛋白質結合，蛋白質間結合など，複雑な相互作用を介して mRNA 前駆体の構造を変化させながら，適切にスプライス部位を切断しエキソン部分の再結合を行なっていく(図 2)⁷⁾。なお，各 snRNP の役割については，他書を参考にされたい⁸⁾。

2. 選択的スプライシング

A. スプライス部位選択の制御機構

選択的スプライシングとは，複数のイントロンをもつ前駆体 mRNA が異なる様式のスプライシングを受けることによって，1 個の遺伝子から複数種の mRNA が産

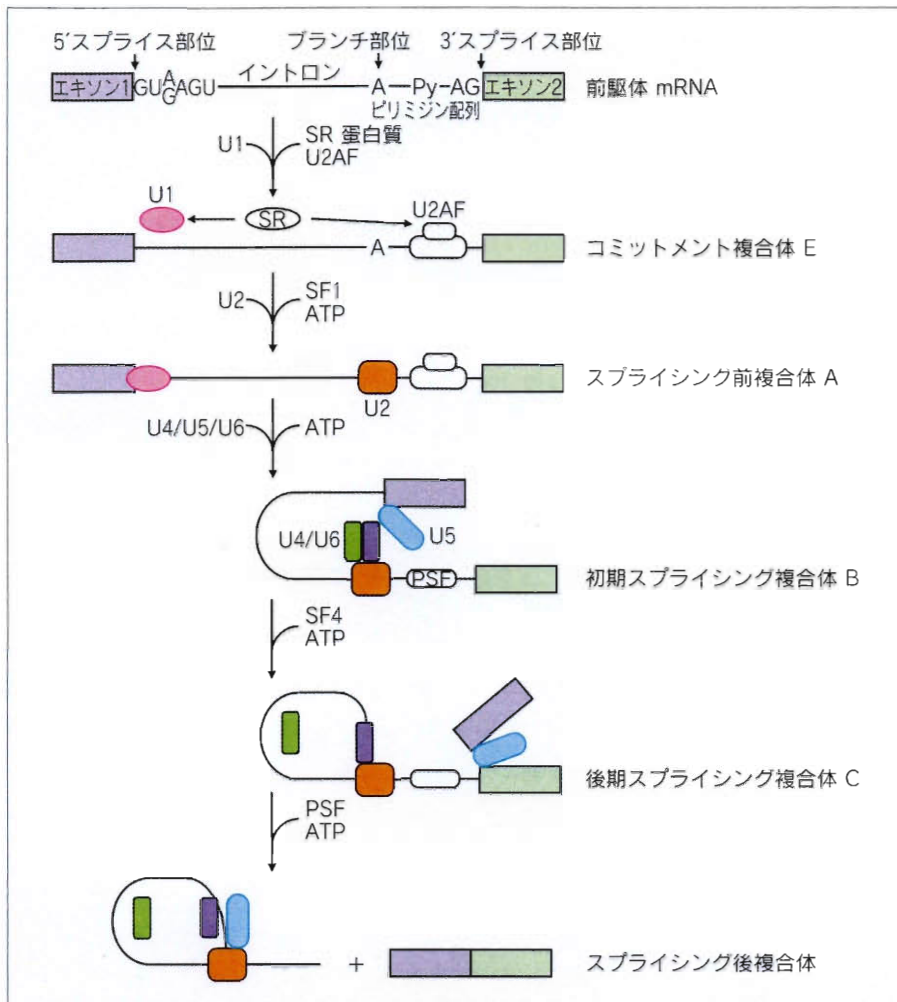


図2 スプライソソーム中におけるスプライシングの進行
 前駆体 mRNA 上に snRNPs および SR 蛋白質などのスプライシング必須因子が直接あるいは間接に結合し、順次、複合体成分を変化させながらスプライシング反応が進む。
 [文献7より改変して転載]

生されることをいう。上述したように、脊椎動物におけるスプライス部位やブランチ部位の保存性は高くない。そのため、スプライシングの信号配列の選択に自由度が生まれ、選択的スプライシングが可能になる。選択的スプライシングによるエキソン選択は、どの5'スプライス部位とどの3'スプライス部位を選択するかという組み合わせによって決定される。両スプライス部位の選択は、U1-snRNPの5'スプライス部位への結合とU2-snRNPのブランチ部位への結合によって形成される、初期スプライシング複合体によって決まる。スプライス部位の配列の違いによってU-snRNPの結合効率が変化し、結果的に、スプライス部位認識の“強さ”に違いが生じる。その結果、あるスプライス部位は選択されず、別のスプライス部位だけが選択され、選択的スプライシングが起こるのである。

しかし実際は、スプライス部位の配列がコンセンサス配列とはかなり異なる配列を有するものがU-snRNPに

認識され、スプライシングを受けることが多い。これは、スプライス部位に近接したエキソン内あるいはイントロン内に、スプライシングを促進するスプライシングエンハンサーとよばれる特殊な信号配列が存在しているためである。エキソン内にあるスプライシングエンハンサー(exonic splicing enhancer; ESE)の多くはプリン残基に富んだ配列をもっており、そこにSR蛋白質とよばれる一群のRNA結合蛋白質が結合する。これがU1-snRNPあるいはU2-snRNPのスプライス部位への弱い結合を助け、スプライシングを促進することが知られている^{2,9,10)}(図3a)。また逆に、スプライシングを抑制するような信号配列スプライシングサイレンサーもエキソン内には見いだされており、これをexonic splicing silencer(ESS)とよぶ²⁾。さらに、イントロン内にも同様にスプライシングサイレンサー(intronic splicing silencer; ISS)があり、ESEの働きに影響を与えてエキソン選択を制御している。

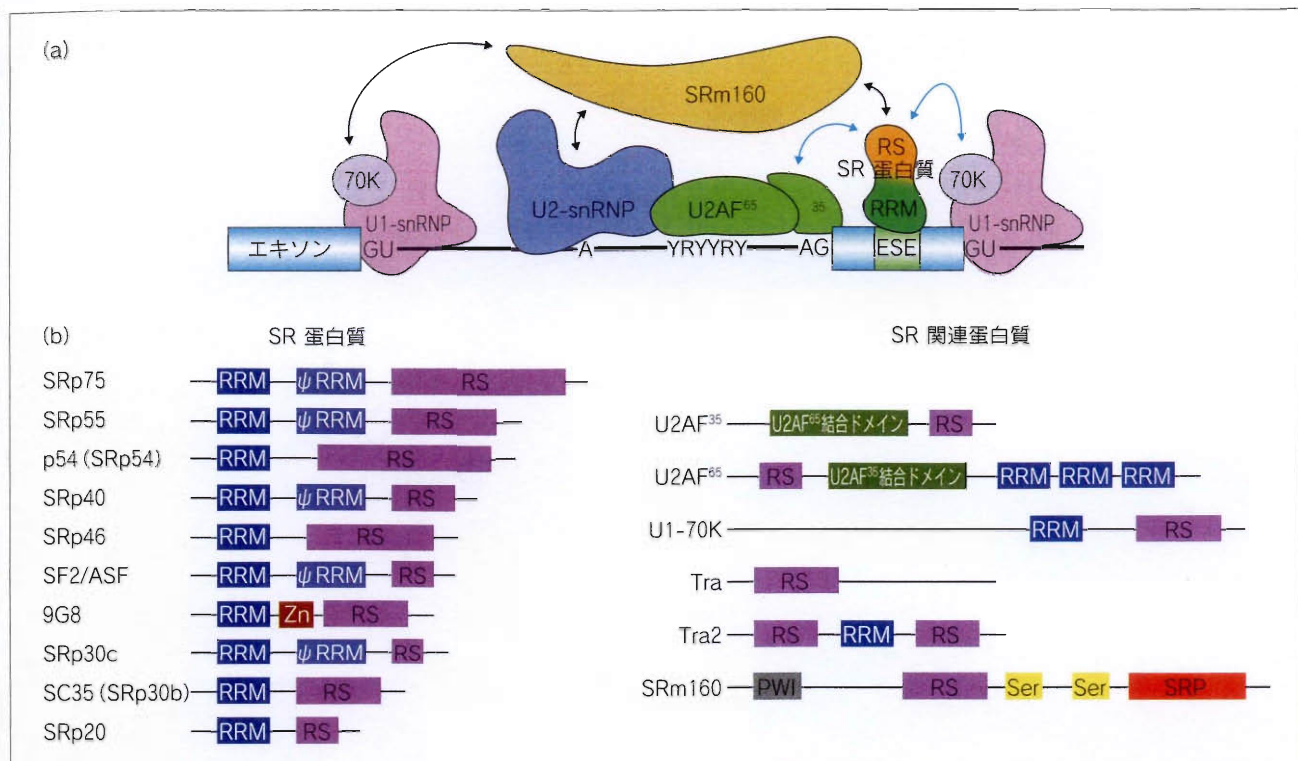


図3 ESE依存性スプライシングのモデルとSR蛋白質の構造

(a) SR蛋白質はRRMを介してESE配列に結合し、それと同時にRSドメインを介してスプライシング因子であるU2AF³⁵および/あるいはU1-70Kとスプライス部位近傍で結合する(青矢印)。U2AFはU2AF³⁵とU2AF⁶⁵の2つのサブユニットからなり、そのうちの大型サブユニットであるU2AF⁶⁵が3'スプライス部位近傍のポリピリミジントラクト(YRYRYR:ピリミジンのくり返し配列)に直接結合してU2-snRNPのプランチ部位への結合を促進する。ポリピリミジントラクト中にはプリン塩基が混在し、3'スプライス部位が弱い場合でもU2AF⁶⁵はこの部位に結合できるので、弱い3'スプライス部位をもつ遺伝子スプライシングにはU2AF⁶⁵が必須である。U1-snRNPは5'スプライス部位にU1-snRNAの塩基対形成により結合する。U1-70KはU1-snRNPのコンポーネントである。スプライシングの活性化因子のひとつであるSRm160がU1-snRNPやU2-snRNPと相互作用(黒矢印)し、スプライシングを活性化することもある。

[文献2より改変して転載]

(b) SR蛋白質(左)およびSR関連蛋白質のドメイン構造(右)。SR蛋白質は1個ないし2個のRNA認識モチーフ[RRMおよびΨRRM(変形RNA認識モチーフ)]がN末端側に存在し、アルギニン/セリンのくり返し配列(RSドメイン)がC末端側にある。Zn:ジンクナックル。RSドメインをもつが構造的にも機能的にも異なるものがSR関連蛋白質である。SRm160は、機能がわかっていないPWIモチーフとセリンリッチモチーフ(Ser)、そして、セリン、アルギニンおよびプロリンリッチモチーフ(SRP)を有する。

[文献9および11より改変して転載]

B. SR蛋白質の構造と機能

ESEに結合してスプライシングを促進するSR蛋白質の構造を、図3bに示した^{9,11)}。これまでに10種類のSR蛋白質が報告されている。構造上の特徴として、N末端側に1個ないし2個のRNA認識モチーフ(RRM)、C末端側にアルギニン残基とセリン残基を豊富に含むRSドメインをもつ。RRMモチーフはRNAとの結合に、RSドメインは蛋白質相互作用に関与している。また、このSR蛋白質によく似た構造をもつ蛋白質として、SR関連蛋白質がある。これらは、U1-snRNPの5'スプライス部位への結合およびU2-snRNPのプランチ部位への結合を促進することにより、初期スプライソームを形成

させスプライシングを活性化させる。さらに後期過程においては、U4/U6-snRNPおよびU5-snRNPのスプライソームへのリクルートを促進する機能も知られている。また、ESEに結合したSR蛋白質とスプライソームの構成成分との橋渡しを行なうことで、スプライシングの活性化因子として働くSR関連蛋白質(SRm160/300)も知られている。SR蛋白質およびSR関連蛋白質ともに、RSドメインが蛋白質間結合に作用するには、特定のリン酸化酵素によってリン酸化される必要がある。SR蛋白質は恒常的スプライシングに必要であり(一部のSR蛋白質は必須)、選択的スプライシングにおいてはスプライシング部位の選択の調節をしている。後述するが、

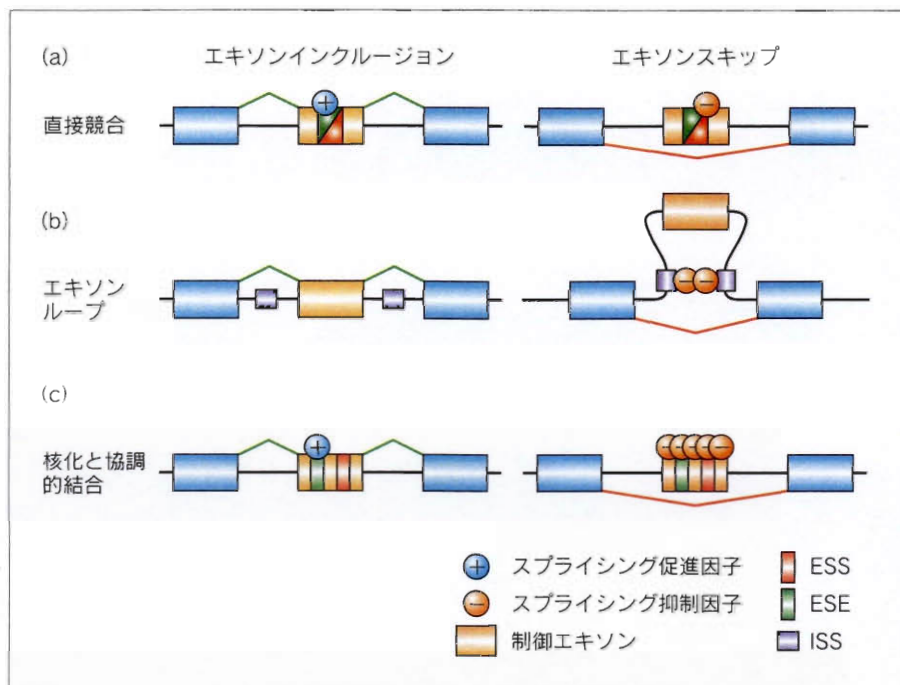


図4 スプライシングの抑制機構モデル

(a) 直接競合：ESEとESSがオーバーラップして前駆体 mRNA 上に存在する場合、促進因子(SR 蛋白質など)と抑制因子(hnRNP など)が競合して、それぞれの機能に影響を与える。促進因子の高い場合は、そのエクソンが含まれるスプライシングが起こり、逆に、抑制因子の効果が勝る場合、エクソンはスキップされる。

(b) エクソンループ：エクソンの両側のイントロンに存在する ISS に hnRNP などのスプライシング抑制因子が結合し、さらに抑制因子どうしが相互作用をすることでエクソンをループアウトする。

(c) 核化と協調的結合：ESS に結合した抑制因子が前駆体 mRNA 上で多数結合することによって、ESE をマスキングする。

[文献2より改変して転載]

ESE 配列に点突然変異が起こると SR 蛋白質が ESE 配列に結合できなくなり、スプライシング障害で疾患が発症するケースも少なくない。

C. スプライシングサイレンサー

サイレンサーについては、エンハンサー(ESE)に比べるとあまりくわしく解析されていない。しかし注目すべきは、3つのエクソンが連結した真ん中のエクソンにヒト DNA 断片をランダムに挿入させたミニジーンをつくと、約 1/3 の DNA 断片はスプライシングに対して阻害的に働くということである。つまりこれは、遺伝子配列中にスプライシングを抑制させるサイレンサーが多数組み込まれていることを示唆する。サイレンシングの機序について比較的よく調べられているのは、イントロン上のサイレンサー ISS で、ごく一部ではあるがエクソン上のサイレンサー ESS の存在もわかってきている。サイレンサー配列には hnRNP (heterogenous nuclear ribonucleoprotein) 蛋白質群などが結合することでスプライシングを負に制御している。hnRNP 蛋白質は1個ないし複数の RNA 結合ドメインをもち、RNA と直接結合する。現在、スプライシングの抑制機構として考えられているモデルとして、(1) ESE と ESS が近接しているエクソンでスプライシング促進因子と抑制因子が競合する(直接競合)、(2) ISS に結合した抑制因子どうしの相互作用により、エクソンをループアウトする(エクソン

ループ)、(3) 抑制因子が多数結合することによる ESE 配列のマスキング(核化と協調的結合)、の3つが提唱されている(図4)²⁾。

II. スプライシングの破綻と疾患

1. スプライシング異常と遺伝性疾患

ヒト遺伝性疾患における点突然変異のうち、約 15% がスプライシング異常によるものと見積もられている¹²⁾。このようなスプライシング異常をもたらす変異はスプライス部位のコンセンサス配列に集中しており、変異配列の近傍のエクソンをスキップさせる。また、まれなケースであるが、変異によって新たに異所性のスプライス部位(cryptic splice site, 隠れたスプライス部位)が形成され、その部分でスプライシングを受けて本来の構造とは異なった mRNA が産生されてしまうこともある。現在のところ、点変異がもたらす mRNA あるいはコードされる蛋白質への影響は、通常、遺伝子配列に基づいて予想され、翻訳される蛋白質の変異が問題視されているが、その変異が mRNA の発現レベルやスプライシングパターンにどう影響を与えているかについては、実験的にはほとんど調べられていない。したがって、スプライス部位の変異はスプライシングに影響を与えていること

は容易に予想されても、コーディング領域における変異に関しては、ミスセンス変異、ナンセンス変異としてコードする蛋白質の構造変化を起こし、病気に至るものと考えられがちである。また、サイレント変異は、遺伝子多型として分類されてしまうのが一般的である。

しかし実際は、エキソン部分に起こる点突然変異では、スプライシングの調節に必要なシス配列が破壊されることにより正常なスプライシングが起こらず、その結果、異常蛋白質が翻訳されることも多い。たとえば、ESEに変異が起こることでエキソンがスキップし、変異蛋白質が産生されるケースがそれにあたる。最近、I型神経線維腫症と毛細血管拡張性運動失調症のそれぞれの原因遺伝子(*NFI*, *ATM*)のDNAおよびRNAレベルでの解析が行なわれ、これら疾患の約50%程度(それぞれ52例中26例, 62例中30例)にエキソンスキップやcryptic splice siteの形成による異常スプライシングが起こっていることが明らかにされた^{13,14)}。そのうちのいくつかは、ゲノム配列に基づきフレームシフトやミスセンス変異あるいはナンセンス変異として間違って分類されていたのである。この報告は、ゲノム情報のみに基づいた遺伝性疾患の解析評価の問題点を指摘するとともに、遺伝子変異が与えるスプライシングへの影響が想像以上に大きいことを示す報告として注目される。

2. 神経変性疾患における異常スプライシング

神経疾患にはスプライシング異常により発症するものが多い。おそらく、神経系に特異的な機能を有した遺伝子が多数存在すること、あるいは、異常スプライシングから産生される変異蛋白質の蓄積に神経細胞が脆弱であることなどが原因として考えられる。ここではいくつかの神経変性疾患に焦点をあて、それぞれの疾患でみられる異常スプライシングのメカニズムを解説する。

A. 前頭側頭型痴呆症

前頭側頭型痴呆症は、前頭葉と側頭葉の萎縮を示し、性格変化、健忘、自発運動の低下、さらにはパーキンソン病様の症状をしばしば呈する一群の進行性痴呆である¹⁵⁻¹⁷⁾。1998年、その原因遺伝子が17番染色体17q21-22に存在する*tau*遺伝子であることが明らかになった。*tau*蛋白質は微小管結合蛋白質の一種であり、おもにチューブリンと結合し、微小管重合を促進・安定化する。また、神経細胞で強く発現し、神経細胞の形態形成、軸索極性、軸索輸送にかかわっている。*tau*遺伝子は選

択的スプライシングによる3つのエキソン(エキソン2, エキソン3, エキソン10)の挿入の有無によって、6種のアイソフォームが発現する。*tau*蛋白質はC末端側のくり返し配列領域によって微小管と結合する。微小管と結合するくり返し配列には、3つのもの(3リピート*tau*)と4つのもの(4リピート*tau*)があり、この違いはエキソン10の挿入の有無による(図5a)。通常、成人において4リピート*tau*はすべての*tau*のうち3割程度で、3リピート*tau*より微小管重合能が2.5~3倍程度高い。

前頭側頭型痴呆症の遺伝子変異はこれまでに10種類以上が報告されている。それらには大きく分けて、遺伝子配列上アミノ酸配列が変化するミスセンス変異と、エキソン10近傍のイントロンにおける変異の2種類がある^{16,17)}。G272V, P301L, V337M, R406Wなどのミスセンス変異は、微小管結合領域あるいはその近傍に存在し、*tau*蛋白質の微小管重合促進能を低下させることが確認されている¹⁸⁾。一方、エキソン10近傍のイントロンにおける変異は、*tau*エキソン10の選択的スプライシングに影響を与える。図5bに示すように、*tau*エキソン10の3'末端からイントロン10の5'末端はステムループを形成し、U1-snRNPが5'スプライス部位へアクセスすることを制限する構造となっている。この部位における変異はステムループ構造を不安定化し、U1-snRNPのアクセスを容易にさせ、エキソン10のスプライシングを活性化する。その結果、4リピート*tau*の発現の割合が増加し、本来、一定の割合で発現する3リピート*tau*と4リピート*tau*の量的バランスが崩れて細胞傷害の原因になる。実験的にも、また、実際の患者の*tau*mRNAおよび蛋白質の解析でも、エキソン10の割合の増加が明らかにされている^{16,17)}。

エキソン10での変異のうち、N279K, L284L, N296N変異は4リピート*tau*の増加を促し、一方、3塩基が欠損するK280欠損変異では3リピート*tau*のみが発現する^{2,19)}。つまり、エキソンにおけるこれら変異は、エキソン10の選択的スプライシングに影響を与えているのである。*tau*エキソン10の5'側にはプリン残基に富むESEがあり、その3'側にESS配列と想定される領域が近接している(図5c)。N279KおよびL284L変異はESEの高次構造を変化させ、ESEの機能をさらに活性化させることによってエキソン10のスプライシングを促進させる。一方、K280欠損変異は、プリン残基であるAAG配列が欠損することによってESE機能が完全に失

図5 tau 遺伝子の選択的スプライシングとその異常

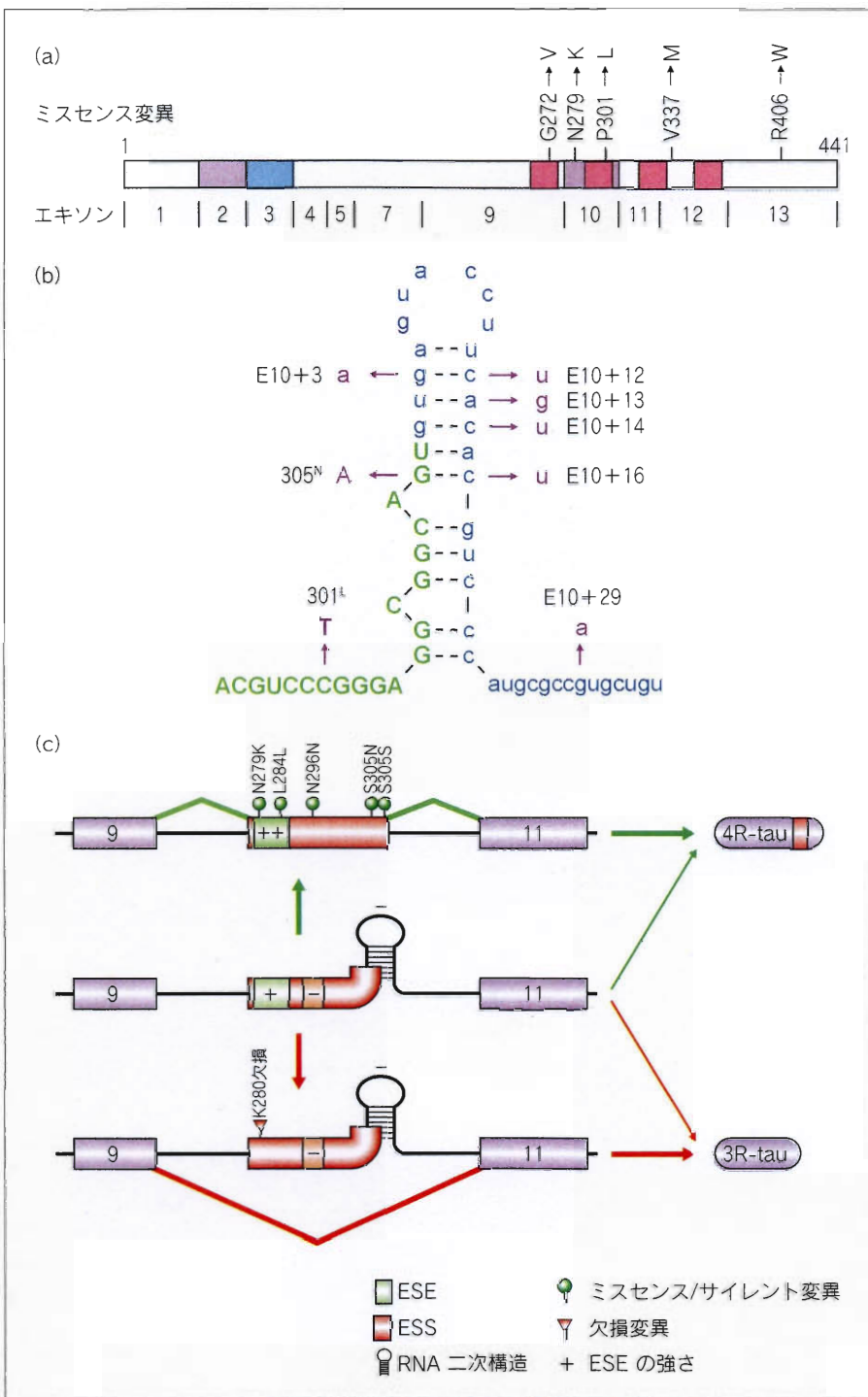
(a) tau 遺伝子の構造とミスセンス変異部位。赤で示した部分は微小管結合ドメイン、紫および青で示した部分は選択的スプライシングを起こすエクソンを示す。エクソン10には微小管結合ドメインがひとつ存在し、このエクソンを含むスプライシングが起こると4リピートtauが、スキップするスプライシングが起こると3リピートtauが産生される。ミスセンス変異は微小管結合領域とその近傍に集中する。

(b) イントロンにおける変異。大文字がエクソン10の部分、小文字がイントロン部分、これまで発見されているエクソン-イントロン結合部分の変異は、この部分に形成されるステムループ構造を不安定化し、U1-snRNPの結合活性を亢進させる。その結果、エクソン10を含むスプライシングを誘導する。

[文献19より改変して転載]

(c) tau 遺伝子エクソン10の遺伝子変異によるスプライシング異常。tau エクソン10にはESE(緑)とESS(赤)が存在し、選択的スプライシングを受ける(中央)。N279KおよびL284L変異はESE活性を上昇させスプライシングを促進して、4リピートtauの産生を増加させる。N296N変異はESS活性を抑制することでエクソン10のスプライシングを促進する。S305NおよびS305S変異は(b)で示したメカニズムによりスプライシングを促進する(上段)。3塩基欠損を起こすK280欠損変異(下段)はESE活性を消失させ、エクソン10が完全にスキップするスプライシングが起こる。

[文献2より改変して転載]



われ、エクソン10をすべてスキップするスプライシングが起こる。N296N変異の場合は、ESS機能が阻害されることによってエクソン10のスプライシングを促進させる。tau エクソン10のESEおよびESSに結合し、スプライシング活性を調節する因子はいまのところ明らかにされていない。N279K変異によってGAAのくり

返しが新たに挿入され、これによりESE機能が活性化されることから、ESEに結合する因子としてSR関連蛋白質のひとつであるtra2βがその候補としてあげられている^{20,21)}。

以上のように、特定エクソンのスプライシングが微妙に変化することで重篤な疾患をひき起こしてしまう典型

的な疾患がこの前頭側頭型痴呆症である。3リピート tau と 4リピート tau が適度な割合で発現するようにスプライシングを厳密に制御することが、神経系の正常な発生および高次機能の維持に重要なのである。

B. 脊髄性筋萎縮症

脊髄性筋萎縮症は、脊髄の運動神経細胞(脊髄前角細胞)の変性によって起こる神経原性の筋萎縮症で、常染色体劣性遺伝病である²²⁾。症状としては、体幹や四肢の筋肉の脱力、筋萎縮がみられる。5番染色体に存在する *SMN* (*Survival motor neuron*) 遺伝子が原因遺伝子として同定されている²³⁾。ヒトでは *SMN* 遺伝子は2つ存在し、隣接して逆向きに並んでいる。テロメア側のものを *SMN1*、セントロメア側のものを *SMN2* とよんでいる。これらの2つの遺伝子は、いずれも8個のエキソンからなり、遺伝子配列上はまったく同じ蛋白質をコードすることになっている。しかし、*SMN1* はエキソン1から8までのすべてのエクソンが転写されるが、*SMN2* は大部分がエキソン7を含まない選択的スプライシングを受けている。そのため、実際には *SMN2* からは *SMN1* とは異なった蛋白質が翻訳される。この原因は、*SMN2* のエキソン7の5'末端から6番目の塩基がシトシン(C)からチミン(T)に変異しているためである。この1塩基の違いによって、*SMN2* 遺伝子からは80%以上がエキソン7を欠失した mRNA が産生されている(図6a)。エキソン7を欠いた *SMN* 蛋白質は不安定であり、発現したとしても本来の機能^{*1} をもたないと考えられている^{24,25)}。脊髄性筋萎縮症患者のほとんどは、*SMN1* 遺伝子に欠失または変異がみられるのに対して、*SMN2* 遺伝子には異常はみられない場合が多い。よって、*SMN2* 遺伝子からエキソン7を含む全長型蛋白質がどれだけ発現されるかが患者の重症度に影響を与える。つまり、*SMN2* 遺伝子から全長 *SMN* 蛋白質が多く発現すれば比較的軽症となり、発現されなければ重症度が増す。

SMN1 遺伝子と *SMN2* 遺伝子はエキソン7の1塩基の違いだけでスプライシングパターンが変化することから、*SMN2* 遺伝子の場合も *tau* 遺伝子と同様に、塩基置換により ESE 機能が破壊され、エキソン7がスキップ

していると考えられる。Hofmann らは *SMN1* のエキソン7の遺伝子配列を調べ、エキソン7の中央部にプリン塩基がくり返す部位を見いだすとともに、その配列に SR 関連蛋白質である *tra2β* が特異的に結合して ESE 活性を亢進していることを明らかにしている²⁶⁾。しかし、この時点では、エキソン7の5'末端から6番目の1塩基置換(C→T)により *SMN1* と *SMN2* とのスプライシングのあいだに大きな違いをひき起こされる理由はわからなかった。その後、Kraimer らのグループによって、*tra2β* 依存的な ESE とは別に、塩基置換が起こっている領域に新たな ESE があることが見いだされた²⁷⁾。彼らは、ESE ファインダー^{*2} というコンピュータソフトウェアを使い、エキソン7の5'末端に SR 蛋白質の SF2/ASF が結合する ESE 配列になりうる候補配列があることを探し出した。実験的にも、その ESE 配列に SF2/ASF が直接結合し、*SMN1* エキソン7のスプライシングを活性化していること、さらには、*SMN2* タイプの配列(エキソン7の5'末端から6番目のCがTに変異)に対しては SF2/ASF の結合活性が低下し、ESE 機能を明らかに低下させることを証明した。以上の2つの研究成果から、*SMN* エキソン7のスプライシング機構は図6aのように想定されている。また最近では、エキソン7の前後イントロン内に *SMN* エキソン7の選択的スプライシングを制御するシス配列が存在することも明らかにされている^{28,29)}。

脊髄性筋萎縮症患者には *SMN2* 遺伝子は残存しているので、*SMN2* 遺伝子から人工的にエキソン7を含むスプライシングを活性化できれば、その治療に応用できる。最近、スプライシングさせたいエクソンにハイブリダイズできる核酸に、SR 蛋白質の RS ドメインの機能を付与したペプチドを化学的に架橋させたキメラ分子を用いて、標的遺伝子のスプライシングを活性化させる新しい手法が開発された (for exon-specific splicing enhancement by small chimeric effectors; ESSENCE)³⁰⁾。キメラ分子は、標的配列に対して相補的な12塩基からなる標的ドメインと、スプライシングマシーナリーとの相互作用を仲介するRSドメインとしてアルギニン/

*1 *SMN* 蛋白質の機能：*SMN* 蛋白質は細胞質内および核内に存在する。核内では gems とよばれる構造体に存在して、それ自身で会合してオリゴマーを形成するとともに、ほかの多くの蛋白質と相互作用し複合体として存在している。*SMN* 複合体と会合する分子の多くは RNA-蛋白質複合体(RNP)に存在するため、U-snrNP 群の会合やスプライソソーム形成に働く因子であると考えられている。

*2 ESE ファインダー：調べたい塩基配列に4種類のSR蛋白質(SF2/ASF, SC35, SRp40, SRp55)が結合できるモチーフが存在するかどうかを定量的に検索できるソフトウェア。このソフトウェアは、コールドスプリングハーバー研究所のホームページで公開されている(<http://rutai.cshl.edu/tools/ESE/>)。

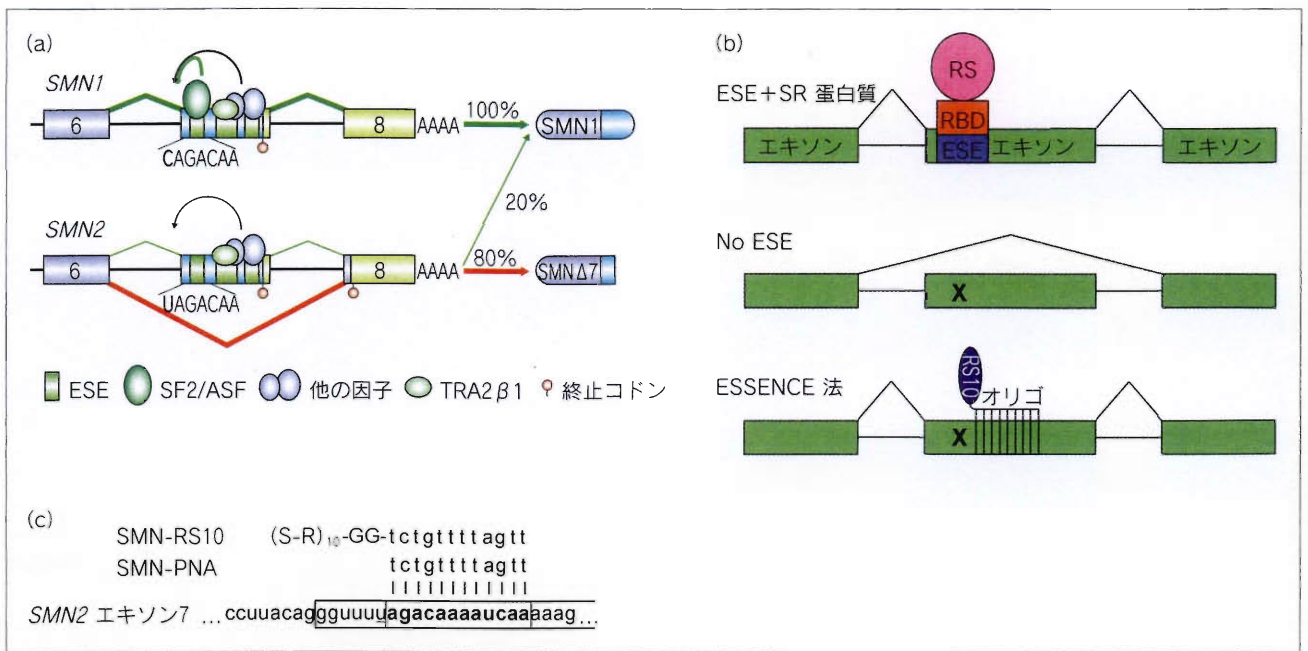


図 6 SMN 遺伝子のスプライシング制御と ESSENCE 法

(a) *SMN1* では終止コドンを含むエクソン 7 が含まれるスプライシングが起こる。*SMN2* の場合は 80% がエクソン 7 をスキップし、エクソン 8 で蛋白質翻訳が終結する。その結果、エクソン 7 を欠いた SMN 蛋白質では、C 末端構造にエクソン 7 を含むものとは異なり、翻訳産物の安定性がきわめて低い。*SMN1* と *SMN2* 遺伝子の違いは、エクソン 7 の 5' 末端から 6 番目の塩基が、*SMN1* 遺伝子ではシトシン(C)、*SMN2* 遺伝子ではチミン(T)になっていることである。この塩基置換によって、*SMN2* では SF2/ASF 依存性の ESE 活性が不活化する。もうひとつの ESE はエクソン 7 の中央部にあり、tra2 β 1 を含むスプライシング因子が結合しスプライシングに影響を与える。

[文献 2 より改変して転載]

(b) ESSENCE 法の概略。ESSENCE 法は SR 蛋白質による ESE 依存性スプライシングの機構を応用している。上段は ESE 依存性の SR 蛋白質によるスプライシングを示す。塩基変異により ESE が破壊されるとエクソンはスキップする(中央)。ESSENCE 分子は標的の前駆体 mRNA に相補的に結合し、RS ドメイン(RS10)を使ってスプライシングを活性化させる(下段)。

[文献 30 より改変して転載]

(c) ESSENCE 法に用いるキメラ分子の核酸部分の塩基配列とターゲットとなる *SMN* 遺伝子とがハイブリダイズする部位を示す。四角で囲まれた部分がエクソン 7。SMN-RS10: SMN の ESSENCE キメラ分子、SMN-PNA: *SMN* 遺伝子のアンチセンスペプチド核酸。

[文献 30 より改変して転載]

セリンを 10 回くり返したリクルートドメインからなるシンプルな構造である。このキメラ分子を細胞に導入して *SMN2* 遺伝子のスプライシングに与える影響を調べたところ、全体の 60% が全長型 SMN 蛋白質を発現した。キメラ分子の作用機構と *SMN2* エクソン 7 に対するターゲティング戦略図を図 6b に、用いたキメラ分子の配列を図 6c に示した。ESSENCE 法を治療に応用するには、生体内でのキメラ分子の安定性や、臓器組織へのデリバリーの問題が残されているが、特定遺伝子のスプライシングを人工的に効率よく制御する方法としては、現在のところもっとも有力な方法と考えられる。

■ C. 筋強直性ジストロフィー

筋強直性ジストロフィーは常染色体優性遺伝病で、症状としては、筋強直・筋萎縮などの筋症状に加え、白内

障、不整脈、糖尿病など種々の全身症状がみられる³¹⁾。筋強直性ジストロフィーの一部は、*DMPK* (*dystrophia myotonica protein kinase*) 遺伝子の 3' 非翻訳領域に存在する CTG の 3 塩基くり返し配列が異常伸長するトリプレット病のひとつであることが明らかにされた³²⁻³⁴⁾。*DMPK* 遺伝子は正常でも 3' 非翻訳領域に約 37 個の CTG くり返し配列をもつが、筋強直性ジストロフィー患者ではこのくり返し配列が 50~5,000 個にも伸長している。リピート長と重症度が相関すること、親より子でリピートが伸長し発症が早まる表現促進現象がみられることなど、ほかのトリプレットリピート病と同様の特徴を有している。

病態機序については、CTG リピートの伸長が、① *DMPK* 蛋白質の発現に影響する、② *DMPK* 近傍の遺伝

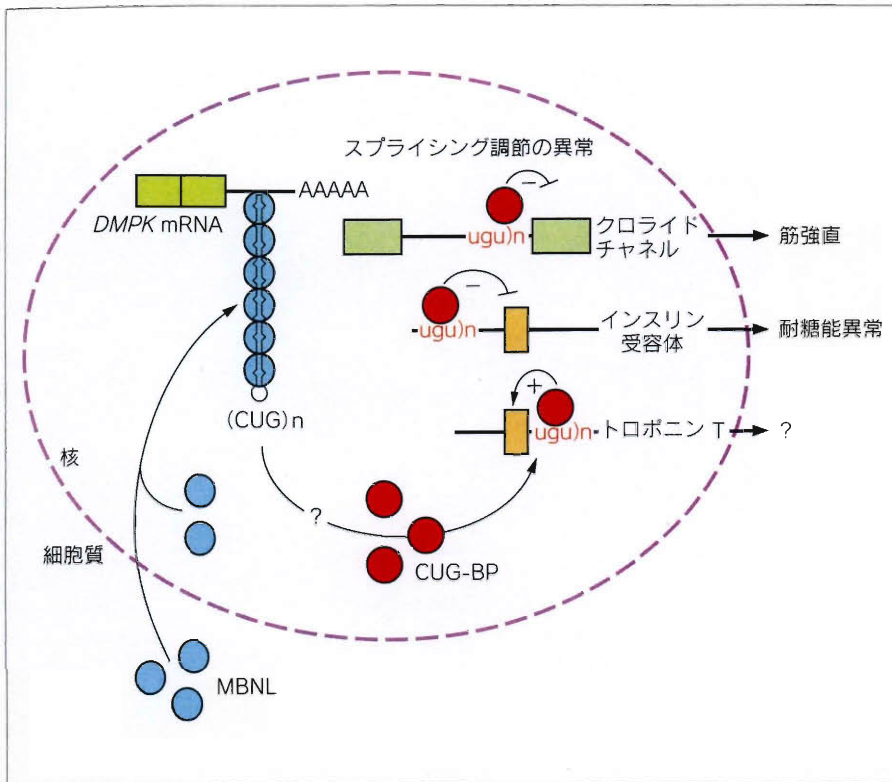


図7 DMPK 遺伝子内CTG リピー
ト伸長が及ぼす異常スプライシング
のモデル図

DMPK mRNA内のCUGリピー
トは2本鎖ヘアピン構造をとる。そこに
muscleblind (MBNL)などのCUG
結合蛋白質がリクルートされ、核内に
ribonuclear inclusionとよばれる凝集
体を形成する。この凝集体形成はなんら
かのメカニズムでCUG-BPを活性化さ
せる。活性化したCUG-BPはクロライ
ドチャンネル、インスリン受容体および
トロポニンTの遺伝子のイントロン領域
に存在するU/Gモチーフに結合し、そ
れぞれの選択的スプライシングに影響を
与える。クロライドチャンネルとインス
リン受容体の遺伝子に対しては、CUG-BP
は結合位置から下流のエキソンに抑制的
に作用してエキソンをスキップさせる。
一方、トロポニンTの遺伝子に対して
は、結合位置から上流のエキシンのス
プライシングを促進する。これらの異常ス
プライシングの結果、筋強直性ジスト
ロフィーの多彩な症状をひき起こされ
ることが示唆されている。

[文献41より改変して転載]

子発現に影響する、③リピー
トが伸長したmRNAその
ものが毒性を示す、などの仮説が提唱された。それぞれの
観点から研究が行なわれた結果、③が筋強直性ジス
トロフィーの筋病変をひき起こす原因として考えられる
ようになってきた。その仮説を裏づける決定的な根拠
は、DMPKとは関係のない骨格筋アクチン遺伝子の3'
非翻訳領域にCTGリピートを挿入し骨格筋に発現させ
ると、筋強直性ジストロフィーに似た筋病理変化、筋強
直現象がみられたことである³⁵⁾。つまり、CTGリピー
トが伸長したmRNAが存在すれば筋強直性ジストロフ
イーの発症に十分であり、DMPKの機能障害や発現障
害は必要でないのである。それでは、なぜmRNA中に
異常に伸長したCTGリピートがあると発症するのだら
うか？ そのメカニズムが解明される前に興味深い現象
が明らかにされていた。そのひとつは、CTGリピート
が伸長しているマウスでは、筋強直と密接にかかわるク
ロライドチャンネルの異常スプライシングが起こっている
ことである³⁶⁾。さらには、トロポニンTおよびイン
スリン受容体のスプライシングにも異常が見いだされ^{37,38)}。
スプライシング障害が筋強直性ジストロフィー発症の原
因ではないかと注目が集まった。これらの異常スプライ
シングを起こした遺伝子には、いずれもエキソン前後の

イントロン内にCUGやUGなどのくり返し配列がある
という共通の特徴がある。CUGのくり返し配列を含む
mRNAは、2本鎖ヘアピン構造という特徴的な立体構
造をとることが想定されている。一方、この配列には、
RNA結合蛋白質であるCUG結合蛋白質(CUG-BP)や
muscleblindファミリー(MBNL, MBLL, MBXL)が
結合して前後エキソンのスプライシングに影響を与え
ることが知られている^{39,40)}。Cooperらは、CUG-BPが筋
強直性ジストロフィーの骨格筋で増加していることを示
すとともに、CUG-BP蛋白質や、CUGが伸長したmRNA
を強制発現させると、筋強直性ジストロフィーでみられ
るいくつかの遺伝子の異常スプライシングと同じ現象を
ひき起こすことを見事に証明した⁴¹⁾。現在考えられて
いるCTGリピートによるスプライシング異常のメカニ
ズムを図7に示した。このような研究成果により、筋強
直性ジストロフィーの機序が明らかにされてきているが、
患者でなぜCUG-BP量が増加し活性化するのか、ある
いは、CUG-BP, muscleblindファミリーによるス
プライシング制御の詳細については不明な点が多い。

D. 孤発性アルツハイマー病

アルツハイマー病は、アミロイドβ蛋白質の沈着、神
経細胞内におけるリン酸化タウの蓄積(神経原線維変

化), および, 神経細胞死を特徴とする進行性の神経変性疾患である⁴²⁾. 早期発症型家族性アルツハイマー病 (FAD) と非遺伝性の孤発性アルツハイマー病に大別され, FAD はその原因遺伝子として, アミロイド前駆体蛋白質 APP, プレセニリン 1 (PS1), プレセニリン 2 (PS2) の遺伝子が同定されている^{43~46)}. 一方, 孤発性アルツハイマー病については発症の詳細な機序はよくわかっていない.

筆者らが孤発性アルツハイマー病の機序解明をめざし研究を始めたころ, 孤発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS, ルー・ゲーリック病としても知られている) では, 患者の脊髄運動神経細胞においてグルタミン酸トランスポーター EAAT2 をコードする遺伝子について, いくつかのエキソンが欠失した, さまざまな異常スプライシング産物が発現していることが報告された⁴⁷⁾. そして, 異常スプライシングにより EAAT2 蛋白質の機能低下をまねき, グルタミン酸の取り込み障害から神経細胞死に至る可能性が指摘されたのである. この現象が ALS の発症原因なのか結果なのかは明らかになっていないが, 孤発性神経疾患にスプライシング障害が関連すると指摘したアイデアは画期的であり, 魅力的であった. 筆者らはこのような論文を参考にして, 孤発性アルツハイマー病患者脳で異常スプライシングを起こしている遺伝子を徹底的に調べた. その結果, FAD の原因遺伝子としてすでに同定されていた PS2 遺伝子のエキソン 5 が欠損したスプライシングバリエント (PS2V) を発見した⁴⁸⁾.

PS2V mRNA は, エキソン 5 を欠失することにより, 野生型 PS2 の N 末端 119 個のアミノ酸をコードしたのちにフレームシフトが起こり, 新たに 5 つのアミノ酸 (SSMAG) を付加して終止する (図 8a). PS2V からは確かに翻訳産物が産生され, 驚くべきことに, これは調査した孤発性アルツハイマー病患者の全例 (22 例) から検出された (図 8b). それに対し, 対照群では 1 例のみに低レベルの発現を認めたが, それ以外はまったく観察されなかった^{49,50)}. このような結果は, PS2 遺伝子の異常スプライシングが孤発性アルツハイマー病にかなり特異的な現象であることを示唆する. しかし, PS2V の発現が疾患の原因のひとつになっているのか, 病気の進行過程のなかで産生されてきた二次的産物なのか, 現段階ではまだ明らかにできていない.

筆者らは, なぜ孤発性アルツハイマー病の脳に PS2 遺伝子の異常スプライシングが起こるのかに興味をもつ

た. PS2V は低酸素環境下で特異的に発現する. 低酸素負荷のとき, PS2 のエキソン 5 をスキップするために必要なシス配列とその部位に特異的に結合するトランス因子の同定を試みた. その結果, PS2 エキソン 5 では, 3' 末端の約 25 塩基が低酸素環境下における異常スプライシングに大きな影響を与えること, さらに, その部位に HMGA1a が特異的に結合することがわかった⁵¹⁾. HMGA1a は U1-snRNP のコンポーネントのひとつである U1-70K とも結合しており, PS2 エキソン 5 の 3' 末端に結合した HMGA1a は U1-snRNP をトラップし, U1-snRNP の 5' スプライス部位へのアクセスを阻害させてエキソン 5 をスキップさせると考えられる (図 8c). これまで, HMGA1a が特定遺伝子のスプライシング制御に働くことはまったく報告されておらず, 新しいタイプのスプライシング制御が明らかになったのである. 興味深いことに, HMGA1a は低酸素環境下で誘導がかかり, スプライシング因子群が集積して存在するスペックルに強く発現する. PS2 以外にも, ストレス環境下で HMGA1a によりスプライシング異常をきたす遺伝子が存在しているもおかしくない.

■ おわりに

ゲノム情報を蛋白質翻訳に正確に変換していく過程において, スプライシングは重要なステップになっている. 多種多様な遺伝子からイントロンとエキソンを認識して忠実に切断し, さらにエキソンどうしの再結合が精密にコントロールされる必要がある. 本文中にも記載したが, ひとつの遺伝子のたった 1 塩基の変異がスプライシングの精密な制御を攪乱し, 重篤な疾患に結びついてしまう.それほど RNA スプライシングは厳密に制御されなくてはならない. その精密さを担うのがさまざまなスプライシング調節因子群と前駆体 mRNA 側に存在するスプライシング信号配列の巧妙な相互作用である. 最近では, スプライシング制御は前駆体 mRNA を切断するだけの独立した事象ではなく, RNA の転写, 分解, 核外輸送などと共役して制御されていることがわかってきている^{52,53)}. それらの情報ネットワークをもとにスプライシングが制御されているのであれば, 話はますます複雑化しそうな様相である. それらネットワークが有機的に働く仕組みの解明がスプライシング研究の今後の課題になる.

ヒト遺伝性疾患がスプライシング異常により起こると

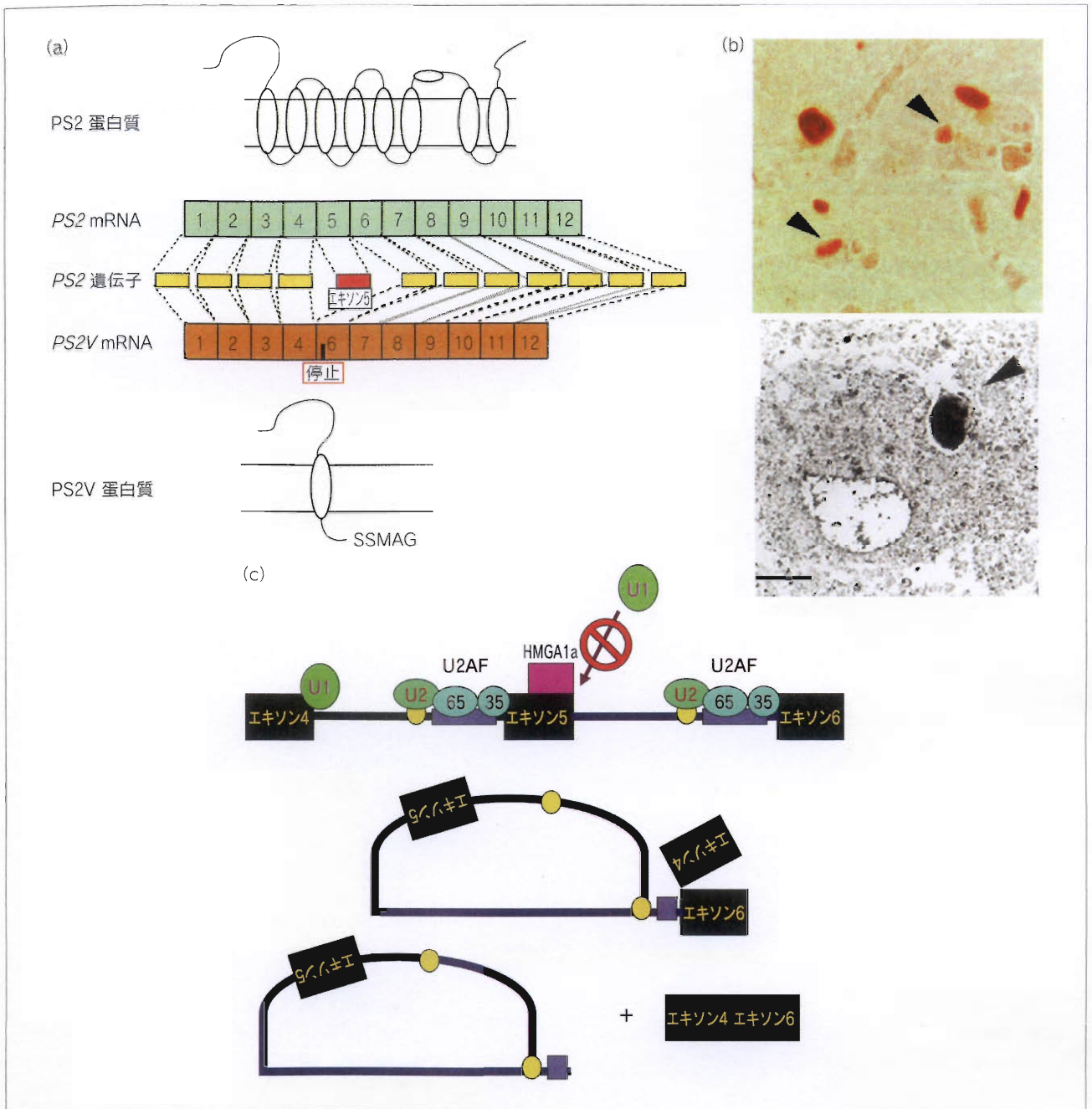


図8 孤発性アルツハイマー病における *PS2* の異常スプライシング

(a) *PS2* および *PS2V* の構造と、それぞれがコードする蛋白質を示す。*PS2V* はエキソン5がスキップすることでフレームシフトが起こり、5つのアミノ酸(SSMAG)をコードしたのち終止する。

(b) *PS2V* から産生される蛋白質は(矢頭)患者の海馬神経細胞に発現する。上：免疫組織化学、下：免疫電子顕微鏡法。

(c) *PS2* のエキソン5欠損モデル。HMGA1aがエキソン5の3'末端に結合し、U1-snRNPの5'スプライス部位へのアクセスを阻害する。その結果、エキソン5のスキップが起こる。

考えられる割合が想像以上に高く驚いている。さらに、遺伝性でない疾患のなかには、ここで紹介したアルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症以外にも、環境因子や各種のストレスなどによりスプライシング制御機構が障害

されて発症する疾患も存在していると思われる。原因のわかっていない非遺伝性の疾患においては、このような異常スプライシングの観点から発症機序を再検討する必要がある。

以上のように、スプライシングはきわめて精巧に構築されたシステムであるが、それと同時に、わずかな狂いで破綻をきたしやすいデリケートなシステムでもある。スプライシング機構の巧妙さと“もろさ”の二面性を十分に理解し、近い将来、人為的にそのシステムをうまく制御できる技術開発が、スプライシング異常を起点とする疾患治療に望まれる。

ここで示した研究成果の一部は、大阪大学大学院医学系研究科遠山正彌教授との共同研究の成果であり、感謝の意を表します。

文献

- 1) Breathnach, R., Chambon, P. : *Annu. Rev. Biochem.*, 50, 349-383(1981)
- 2) Cartegni, L., Chew, S. L., Krainer, A. R. : *Nat. Rev. Genet.*, 3, 285-298(2002)
- 3) Patel, A. A., Steitz, J. A. : *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4, 960-970(2003)
- 4) Padgett, R. A., Mount, S. M., Steitz, J. A., Sharp, P. A. : *Cell*, 35, 101-107(1983)
- 5) Kramer, A., Keller, W., Appel, B., Luhrmann, R. : *Cell*, 38, 299-307(1984)
- 6) Black, D. L., Steitz, J. A. : *Cell*, 46, 697-704(1986)
- 7) Kramer, A. : *Annu. Rev. Biochem.*, 65, 367-409(1996)
- 8) 谷時雄・坂本博 : RNA研究の最前線(志村令郎・渡辺公綱編), pp.101-117, シュプリンガー・フェアラーク東京(2000)
- 9) Blencowe, B. J. : *Trends Biochem. Sci.*, 25, 106-110(2000)
- 10) Fairbrother, W. G., Yeh, R. F., Sharp, P. A., Burge, C. B. : *Science*, 297, 1007-1013(2002)
- 11) Graveley, B. R. : *RNA*, 6, 1197-1211(2000)
- 12) Krawczak, M., Reiss, J., Cooper, D. N. : *Hum. Genet.*, 90, 41-54(1992)
- 13) Ars, E. *et al.* : *Hum. Mol. Genet.*, 22, 237-247(2000)
- 14) Teraoka, S. N. *et al.* : *Am. J. Hum. Genet.*, 64, 1617-1631(1999)
- 15) Poorkaj, P. *et al.* : *Ann. Neurol.*, 43, 815-825(1998)
- 16) Hutton, M. *et al.* : *Nature*, 393, 702-705(1998)
- 17) Spillantini, M. G. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 7737-7741(1998)
- 18) Hasegawa, M., Smith, M. J., Goedert, M. : *FEBS Lett.*, 437, 207-210(1998)
- 19) D'Souza, I. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 5598-5603(1999)
- 20) Jiang, Z. *et al.* : *J. Biol. Chem.*, 278, 18997-19007(2003)
- 21) Kondo, S. *et al.* : *Genes Cells*, 9, 121-130(2004)
- 22) Melki, J. : *Curr. Opin. Neurol.*, 10, 381-385(1997)
- 23) Lefebvre, S. *et al.* : *Cell*, 80, 155-165(1995)
- 24) Lorson, C. L., Hahnen, E., Androphy, E. J., Wirth, B. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 6307-6311(1999)
- 25) Monani, U. R. *et al.* : *Hum. Mol. Genet.*, 8, 1177-1183(1999)
- 26) Hofmann, Y., Lorson, C. L., Stamm, S., Androphy, E. J., Wirth, B. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 9618-9623(2000)
- 27) Cartegni, L., Krainer, A. R. : *Nat. Genet.*, 30, 377-384(2002)
- 28) Miyajima, H., Miyaso, H., Okumura, M., Kurisu, J., Imaizumi, K. : *J. Biol. Chem.*, 277, 23271-23277(2002)
- 29) Miyaso, H. *et al.* : *J. Biol. Chem.*, 278, 15825-15831(2003)
- 30) Cartegni, L., Krainer, A. R. : *Nat. Struct. Biol.*, 10, 120-125(2003)
- 31) Harper, P. S. : *Myotonic Dystrophy*, 3rd Ed., Vol. 37, W. B. Saunders, London(2001)
- 32) Brook, J. D. *et al.* : *Cell*, 68, 799-808(1992)
- 33) Fu, Y. H. *et al.* : *Science*, 255, 1256-1258(1992)
- 34) Mahadevan, M. *et al.* : *Science*, 255, 1253-1255(1992)
- 35) Mankodi, A., Logigian, E., Callahan, L., McClain, C., White, R., Henderson, D., Krym, M., Thornton, C. A. : *Science*, 289, 1769-1773(2000)
- 36) Mankodi, A. *et al.* : *Mol. Cell*, 10, 35-44(2002)
- 37) Philips, A. V., Timchenko, L. T., Cooper, T. A. : *Science*, 280, 737-741(1998)
- 38) Savkur, R. S., Philips, A. V., Cooper, T. A. : *Nat. Genet.*, 29, 40-47(2001)
- 39) Timchenko, L. T. *et al.* : *Nucleic Acids Res.*, 24, 4407-4414(1996)
- 40) Miller, J. *et al.* : *EMBO J.*, 19, 4439-4448(2000)
- 41) Charlet-B, N., Savkur, R. S., Singh, G., Philips, A. V., Grice, E. A., Cooper, T. A. : *Mol. Cell*, 10, 45-53(2002)
- 42) Selkoe, D. J. : *Annu. Rev. Neurosci.*, 17, 489-517(1994)
- 43) Goate, A. *et al.* : *Nature*, 399, 704-706(1991)
- 44) Sherrington, R. *et al.* : *Nature*, 375, 754-760(1995)
- 45) Rogaev, E. I. *et al.* : *Nature*, 376, 775-778(1995)
- 46) Levy-Lahad, E. *et al.* : *Science*, 269, 973-977(1995)
- 47) Lin, C. L. *et al.* : *Neuron*, 20, 589-602(1998)
- 48) Sato, N. *et al.* : *J. Neurochem.*, 72, 2498-2505(1999)
- 49) Sato, N., Imaizumi, K., Manabe, T., Taniguchi, M., Hitomi, J. *et al.* : *J. Biol. Chem.*, 276, 2108-2114(2001)
- 50) Manabe, T. *et al.* : *Neurosci. Lett.*, 328, 198-200(2002)
- 51) Manabe, T. *et al.* : *Cell Death Differ.*, 10, 698-708(2003)
- 52) Lykke-Andersen, J. : *Curr. Biol.*, 11, R88-91(2001)
- 53) Wagner, E., Lykke-Andersen, J. : *J. Cell Sci.*, 115, 3033-3038(2002)

今泉和則

略歴 : 1985年 東京農工大学農学部獣医学科修士課程 修了, 1985年 田辺製薬(株)入社, 2000年 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 助教授を経て, 2004年より 宮崎大学医学部 教授, 研究テーマ : 神経変性疾患の分子機構, 細胞のストレス応答機構.